

## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> : <b>C12Q 1/68, C12P 19/34, G01N 33/53</b>	A1	(11) Numéro de publication internationale: <b>WO 95/07361</b> (43) Date de publication internationale: <b>16 mars 1995 (16.03.95)</b>
---	----	--

(21) Numéro de la demande internationale: <b>PCT/FR94/01068</b> (22) Date de dépôt international: <b>9 septembre 1994 (09.09.94)</b>	(81) Etats désignés: CA, CH, DE, GB, JP, SE, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).
(30) Données relatives à la priorité: 93/10821 10 septembre 1993 (10.09.93) FR	Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont requises.</i>
(71) Déposants ( <i>pour tous les Etats désignés sauf US</i> ): INSTITUT PASTEUR [FR/FR]; 28, rue du Docteur-Roux, F-75724 Paris Cédx 15 (FR). INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE (INSERM) [FR/FR]; 101, rue de Tolbiac, F-75654 Paris Cédx 13 (FR).	
(72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants ( <i>US seulement</i> ): MEO, Tommaso [FR/FR]; 18, rue Quincampoix, F-75004 Paris (FR). TOSI, Mario [FR/FR]; 11, allée Buffon, F-94700 Maisons-Alfort (FR). VERPY, Elisabeth [FR/FR]; 51, rue du Val d'Osne, F-94410 Saint-Maurice (FR). BIASOTTO, Michel [FR/FR]; 5, rue de Draveil, F-91260 Juvisy-sur-Orge (FR).	
(74) Mandataire: LE BRUSQUE, Maurice; Cabinet Harlé & Phélip, 21, rue de la Rochefoucauld, F-75009 Paris (FR).	

(54) Title: METHOD FOR THE DETECTION OF MOLECULES CONTAINING NUCLEOTIDIC MISMATCHES AND LOCATION THEREOF, AND APPLICATION TO DETECTION OF SUBSTITUTIONS OR DELETIONS OF BASES IN NUCLEOTIDIC SEQUENCES

(54) Titre: PROCEDE DE DETECTION DE MOLECULES CONTENANT DES MESAPPARIEMENTS NUCLEOTIDIQUES ET DE LOCALISATION DE CES MESAPPARIEMENTS, ET APPLICATION A LA DETECTION DE SUBSTITUTIONS OU DE DELETIONS DE BASES DANS DES SEQUENCES NUCLEOTIDIQUES

## (57) Abstract

Method for the detection and/or location of mutations or deletions in nucleotidic sequences by the formation of heteroduplexes between two double strand DNA types capable of generating mismatches at the mutation or deletion sites. The heteroduplexes are revealed by marking of each type of strand using different fluorescent molecules or are screened by passing over a support which specifically retains them.

## (57) Abrégé

Procédé de détection et/ou de localisation de mutations ou de délétions dans des séquences nucléotidiques par création d'hétéroduplex entre deux types d'ADN double brin susceptibles de former des mésappariements aux sites desdites mutations ou délétions. Les hétéroduplex sont mis en évidence du fait du marquage sur chaque type de brin par des molécules fluorescentes différentes ou sont ciblés par passage sur un support les retenant spécifiquement.

**UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiées des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Australie	GB	Royaume-Uni	MC	Mauritanie
AU	Australie	GE	Géorgie	MW	Maldives
BB	Bermudes	GN	Crédo	NE	Niger
BE	Belgique	GR	Grece	NL	Pays-Bas
BY	Burkina Faso	GU	Hongrie	NO	Norvège
CG	Bulgare	IE	Irlande	NZ	New-Zélande
BJ	Bénin	IT	Italie	PL	Pologne
BR	Bresil	JP	Japon	PT	Portugal
BT	Bolivie	KZ	Kirghizstan	RO	Roumanie
CA	Canada	KG	Kirghizstan	RU	Fédération de Russie
CF	République centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République du Congo	SE	Suède
CE	Suisse	LS	Lacoste	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LT	Lithuanie	SK	Slovaquie
CO	Colombie	LR	Sierra Leone	SM	San Marino
CN	Chine	LS	Sri Lanka	TD	Tadjikistan
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TO	Togo
CZ	République tchèque	LV	Lettland	TJ	Tadjikistan
DZ	Algérie	MC	Mexico	TT	Tunisie-Tobago
DK	Dakar	MD	République de Moldova	UA	Ukraine
ES	Espagne	MG	Madagascar	US	Frus-Unis d'Amérique
FI	Finlande	ML	Mal	UZ	Ouzbékistan
FR	France	MR	Mauritanie	VN	Viet Nam
GA	Guinée				

PROCEDE DE DETECTION DE MOLECULES CONTENANT DES MESAPPARIEMENTS NUCLEOTIDIQUES ET DE LOCALISATION DE CES MESAPPARIEMENTS, ET APPLICATION A LA DETECTION DE SUBSTITUTIONS OU DE DELETIONS DE BASES DANS DES SEQUENCES NUCLEOTIDIQUES.

La présente invention a pour objet un procédé de détection de molécules contenant des mésappariements nucléotidiques et de localisation de ces mésappariements, et son application à la détection de substitutions ou de délétions de bases dans des séquences nucléotidiques

La majorité des maladies liées à des modifications du génome, soit des organismes hôtes, soit des organismes infectieux est très souvent due à un simple changement d'un ou plusieurs nucléotides. Aussi, des efforts considérables ont été entrepris afin de développer des méthodes pour détecter non seulement des mutations déjà connues mais aussi pour mettre en évidence des mutations inconnues.

Cependant, les méthodes disponibles pour rechercher des mutations ponctuelles inconnues dans des régions d'ADN de taille importante ont toutes des inconvénients qui rendent leurs utilisations difficiles.

Par exemple, les gels d'électrophorèse avec gradient de dénaturation nécessitent des optimisations à l'aide d'ordinateur de la région cible et des conditions d'électrophorèse adaptées à chaque fragment d'ADN (Myers et al. (1987), Methods Enzymol., 135, 501-527).

La technique de conformation polymorphe du simple brin (SSCP), (Orita et al. (1989) - Genomics, 5, 874), en dépit de sa simplicité expérimentale, a montré une sensibilité pour la détection de mutation dans des fragments d'ADN d'environ 150 paires de

bases.

Cependant , aucune de ces méthodes ne donne d'informations précises concernant la localisation de la mutation dans le fragment d'ADN .

5 Les méthodes de séquençage direct , bien que de plus en plus rapides , restent coûteuses et longues à mettre en œuvre pour la recherche de mutations de natures inconnues et ne se sont pas fiables dans le cas de mutations ponctuelles hétérozygotes .

10 Une autre méthode mettant en œuvre une coupure chimique au niveau des mésappariements (CCM) telle que décrite par Cotton et al.( Proc. Natl. Acad. Sci., USA (1988) 85, 4397-4401) est en principe bien adaptée à la mise en évidence de mutations, indépendamment de la 15 longueur et de la composition de la séquence de la région à laquelle on s'intéresse . Elle a été utilisée avec succès dans un grand nombre d'études et a fait récemment l'objet d'une revue (Cotton (1993) Mutation Research 285, 125-144) .

20 Cette méthode a permis la détection de mutations dans des fragments amplifiés par voie enzymatique d'une longueur d'un kilobase.

Aucune méthode actuellement n'est susceptible 25 d'être utilisée de façon routinière pour différentes raisons : manque de fiabilité ( nombre important de faux négatifs) et ensuite en raison de la complexité des méthodes qui font qu'elles ne se prêtent pas à une exécution automatisée.

Par exemple dans la méthode CCM classique , les 30 hétéroduplex, c'est-à-dire les ADN double brin , ou bicafénaires , résultant d'un appariement entre deux molécules d'ADN hétérologues , sont formés entre l'ADN amplifié par voie enzymatique du patient et un 35 fragment d'ADN représentant la séquence de type sauvage marqué à une extrémité à l'aide d'un isotope

radioactif . Les molécules d'ADN hétéroduplex sont formées avec l'ADN correspondant à la séquence de type sauvage marqué à l'extrémité de chacun des brins, codant et non codant, puis sont traitées chimiquement dans des réactions parallèles afin de révéler les mésappariements .

En théorie , en utilisant deux sondes , toutes les mutations devraient être détectées , après les coupures spécifiques des cytosines et des thymines non appariées respectivement induites par l'hydroxylamine et le tétr oxyde d'osmium, puisqu'une cytosine ou une thymine non appariée doit être présente au site de la mutation , soit sur le brin codant soit sur le brin non codant de la sonde marquée par un isotope radioactif .

En pratique , la coupure au niveau de certains mésappariements peut se faire incorrectement , en raison de la nature des bases non appariées et de l'environnement de ces bases .

Ainsi, les sondes utilisées dans la méthode CCM classique ne permettent pas d'avoir simultanément quatre types d'hétéroduplex. Par exemple, Cotton et al. (1993, précédemment cités) ne décrivent qu'un ou deux types d'hétéroduplex.

Un autre inconvénient de cette technique est la nécessité de répéter le marquage radioactif des amorces pour la polymérisation en chaîne (PCR ) et des marqueurs de tailles.

De plus, cette technique rend nécessaire la préparation d'une double série d'hétéroduplex , avec marquage terminal du brin sens et du brin non-sens, afin de détecter séparément les bases modifiées sur l'un ou l'autre brin .

Enfin, la méthode CCM ne permet pas de détecter tous les hétéroduplex et donc ne permet pas de

détecter certaines mutations.

On entend par sonde une séquence nucléotidique marquée comportant un nombre de nucléotides suffisant pour établir la complémentarité spécifique entre cette 5 séquence et la séquence présente dans l'échantillon.

A titre d'exemple, une sonde utilisée selon l'invention peut comporter de 8 à 2.000 nucléotides.

On entend par hétéroduplex un brin d'ADN amplifié avec un brin complémentaire contenant au 10 moins un mésappariement ou une délétion ou boucle de non appariement.

Les demandeurs se sont donc attachés à la mise en œuvre d'une technique plus fiable, plus rapide et automatisable, permettant une détermination sans 15 ambiguïté de la substitution de base , comprenant un nombre réduit d'étapes, et utilisant des marqueurs non radioactifs .

Les demandeurs ont donc montré de manière surprenante que l'on pouvait détecter et positionner d'une manière plus rapide et plus fiable les substitutions de bases dans des séquences nucléotidiques en marquant chacun des brins sens et non-sens par un marqueur fluorescent ou enzymatique.

L'utilisation de marqueurs fluorescents est 25 aussi un avantage en ce qui concerne les conditions générales de mise en œuvre de la méthode tant du point de vue sécurité que du point de vue appareillage . Elle permet d'autre part d'utiliser des marqueurs différents pour chaque brin , sans que ce double 30 marquage implique des difficultés techniques ou matérielles , comme ce serait le cas si l'on devait procéder à un double marquage radioactif .

Les demandeurs ont en outre montré que l'on pouvait détecter de manière rapide des délétions ou 35 substitutions de bases en criblant les hétéroduplex

sur un support les retenant spécifiquement.

Les demandeurs ont aussi montré que , dans le cas de mutations hétérozygotes , on peut mettre en évidence les substitutions de base à partir seulement de l'ADN amplifié de l'échantillon à analyser , sans qu'intervienne dans la réaction un ADN issu d'individus homozygotes présentant l'allèle de type sauvage .

10 Ce mode de mise en œuvre particulier de l'invention évite ainsi d'avoir à préparer un ADN de type sauvage marqué , ce qui élimine une étape dans la réaction et en limite les coûts . Ainsi , la mise en œuvre de ce mode préférentiel nécessite d'utiliser seulement de l'ADN de l'échantillon à analyser .

15 L'invention a de manière générale pour objet la détection et/ou la localisation de mutations ou de délétions dans des séquences nucléotidiques par création d'hétéroduplex entre deux types d'ADN double brin susceptibles de former des mésappariements aux sites desdites mutations et délétions .

20 Selon un premier mode de mise en œuvre les hétéroduplex sont mis en évidence du fait du marquage sur chaque type de brin , sens et non-sens , par des molécules fluorescentes différentes .

25 Selon un second mode de mise en œuvre les ADN ne sont pas marqués et les hétéroduplex sont criblés par passage sur un support les retenant spécifiquement .

30 La présente invention a donc pour objet , selon le premier mode de mise en œuvre un procédé de détection de la présence et de la position de substitutions ou de délétions de bases dans une séquence nucléotidique comprise dans une préparation d'ADN double brin à tester dans lequel :

35 - on amplifie de manière spécifique la région

contenant la séquence nucléotidique d'une part de l'ADN à tester et d'autre part d'un ADN dont la séquence est connue, et l'on marque les brins sens et non sens de ces ADN à l'aide de marqueurs fluorescents, ou de marqueurs non-isotopiques, différents,

- on hybridise les ADN amplifiés, et
- on met en évidence les hétéroduplex formés.

Avantageusement, l'ADN à tester et l'ADN connu sont amplifiés dans la même préparation.

Elle a d'autre part pour objet un procédé de détection de la présence et de la position de substitutions ou de délétions de bases d'une séquence nucléotidique comprise dans une préparation d'ADN double brin hétérozygote ou hétérogène à tester dans lequel:

- on amplifie de manière spécifique la région contenant la séquence nucléotidique de l'ADN à tester et on marque les brins sens et non sens de cet ADN à l'aide de marqueurs fluorescents, ou de marqueurs non-isotopiques, différents,
- on hybridise l'ADN amplifié, et
- on met en évidence les hétéroduplex formés.

Avantageusement, l'ADN hétérogène est constitué d'un mélange d'ADN de deux variants d'une bactérie ou d'ADN extrait de cellules mosaïque d'une tumeur.

Selon un mode particulier de mise en œuvre, les échantillons d'ADN double brin comprenant la séquence nucléotidique à déterminer sont amplifiés par la méthode de polymérisation en chaîne à l'aide de deux amorces situées aux deux extrémités de la séquence que l'on veut amplifier.

Les deux amorces peuvent être marquées respectivement à l'aide de marqueurs fluorescents différents.

La molécule d'ADN double brin à déterminer possède avantageusement une taille comprise entre 150 et 10.000 paires de bases.

Préférentiellement, les hétéroduplex sont mis en évidence par clivage des parties des brins non-appariées.

L'étape d'hybridation est effectuée, selon un mode de mise en œuvre connu de l'homme du métier, par dénaturation et renaturation de l'ADN amplifié, ce qui permet de former des molécules mésappariées si l'ADN contient, à l'état hétérozygote (maladies génétiques) ou de manière hétérogène à l'état de mosaïque cellulaire (masse tumorale mélangée avec des cellules saines en diverses proportions) ou une plusieurs mutations (délétions ou substitutions).

Dans le cas où l'ADN dans lequel on recherche la mutation provient d'une cellule haploïde, les molécules hétéroduplex se ferment si l'amplification d'un mélange d'ADN des deux types, sauvage et muté, a été effectuée.

Préférentiellement, le réactif coupant les parties non appariées est un réactif chimique, tel que l'hydroxyl amine, le tétr oxyde d'osmium ou le permanganate de potassium ou une enzyme telle que la MutY (Lu et Chang, (1992), Genomics, 14, 249-255) ou une des enzymes, endonucléases et glycosylases, décrites par Chang et Lu en 1991 (Nucleic Acid Res., 19, 4761-4766), par Chehabet et Kan en 1989 (Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 86, 9178-9182), par Hennecke et al. en 1991 (Nature, 353, 776-778), par Nickerson et al. en 1990 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 8923-8927), par Wieabauer et Jiricny en 1990 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 5842-5845) ou par Yeh et al. en 1991 (J. Biol. Chem., 266, 6480-6484).

Ils peuvent aussi être mis en évidence par une

méthode biophysique permettant de les différencier des homoduplex, telle que la chromatographie ou l'électrophorèse;

5 Avantageusement, les hétéroduplex sont, préalablement à leur mise en évidence, concentrés par passage sur un support les retenant spécifiquement.

10 Selon le second mode de mise en oeuvre, l'invention a pour objet un procédé de détection de la présence de substitutions ou de délétions de bases dans une séquence nucléotidique comprise dans une préparation d'ADN double brin à tester dans lequel :

15 - on amplifie de manière spécifique la région contenant la séquence nucléotidique d'une part de l'ADN à tester et d'autre part d'un ADN dont la séquence est connue,

- on hybridise les ADN amplifiés , et  
- on met en évidence les hétéroduplex formés par passage sur un support les retenant spécifiquement.

20 Elle a d'autre part pour objet un procédé de détection de la présence de substitutions ou de délétions de bases dans une séquence nucléotidique comprise dans une préparation d'ADN double brin hétérozygote ou hétérogène à tester dans lequel :

25 - on amplifie de manière spécifique la région contenant la séquence nucléotidique de l'ADN à tester,  
- on hybridise l'ADN amplifié, et  
- on met en évidence les hétéroduplex formés par passage sur un support les retenant spécifiquement.

30 Préférentiellement, ledit support porte une protéine liant de manière spécifique les hétéroduplex telle que la MutS. Les hétéroduplex retenus sont révélés par une molécule se fixant spécifiquement sur l'ADN, telle que le bromure d'éthidium ou par tout

autre moyen à la portée de l'homme du métier, tel que la fluorescence ou la radioactivité.

Ledit support peut être constitué de billes, sphères ou particules ou être la paroi d'un puits 5 d'une microplaqué pour test biochimique, recouverts d'un anticorps anti-MutS.

La présente invention est particulièrement adaptée à la détection de substitutions de bases chez des patients atteints de maladies héréditaires , 10 telles l'angiodème , l'hémoglobinopathie, la mucoviscidose, la dystrophie musculaire et chez des patients atteints de maladies cancéreuses telles que le cancer du sein, la leucémie, le cancer du colon et les maladies liées à l'atteinte de séquences oncogènes 15 ou antioncogènes.

L'intérêt du second mode de mise en œuvre de l'invention réside dans le fait qu'il permet de cibler rapidement un grand nombre de préparations d'ADN, une population par exemple.

20 S'il permet une détection d'une mutation, il ne permet pas sa localisation qui peut quant à elle être effectuée par un procédé selon le premier mode de mise en œuvre.

La présente invention a en outre pour objet une 25 composition comportant au moins trois sondes permettant de former des hétéroduplex avec des séquences nucléiques dans lesquelles on recherche la présence ou l'absence de mutations ponctuelles.

Elle a enfin pour objet, des hétéroduplex 30 associés à un complexe constitué par une molécule de type MutS et un anticorps anti-MutS.

La présente invention peut être aisément mise 35 en œuvre par l'homme du métier utilisant ses connaissances générales dans le domaine de la biologie, et en particulier dans le domaine de la

polymérisation en chaîne.

Des renseignements généraux plus particuliers concernant les techniques nécessaires pour la mise en œuvre des méthodes objets de la présente invention peuvent notamment être trouvés dans "PCR Protocols. A guide to methods and applications" ( Innis et al., Academic Press Inc., Harcourt Brace Jovanovich Publishers, 1990).

La présente invention est illustrée sans pour autant être limitée par les exemples qui suivent dans lesquels :

- la figure 1A représente la structure de l'exon 8 du gène Cl-inhibiteur et de régions environnantes,
- la figure 1B représente la séquence de l'exon 8. Cette séquence a été décrite par Tosi et al. ((1986), Gene, 42, 265-272) et Carter et al. ((1991), J. Biochem., 197, 301-308).
- la figure 2A schématise les différents hétéroappariements pouvant avoir lieu dans les régions des codons 452 et 459,
- les figures 2B et 2C représentent respectivement l'intensité de fluorescence de différents oligonucléotides obtenus après respectivement traitement par l'hydroxylamine et le tétr oxyde d'osmium de produits d'hybridation entre les allèles sauvages et mutants correspondant aux régions comprenant les codons 452 et 459,
- la figure 3A schématise les hétéroappariements pouvant avoir lieu dans la région des codons 458 et 467 ,
- la figure 3B représente le profil de coupure par le tétr oxyde d'osmium de mésappariements d'ADN d'un patient hétérozygote pour la mutation Val458Met,
- la figure 3C représente le même type de

profil pour la mutation Pro467Arg ,

- la figure 3D est le profil obtenu par traitement des mésappariements de la figure 3C par l'hydroxylamine ,

5 - la figure 4A représente le fragment de 588 paires de base comprenant le site de restriction de l'enzyme HgIAl,

10 - la figure 4B est la photo d'un gel de migration des produits du traitement par l'hydroxylamine d'appariements entre l'allèle sauvage et l'allèle d'un patient présentant une double mutation en cis dans le fragment illustré sur la figure 4A , à différentes dilutions ,

15 - la figure 4C représente le profil après traitement par l'hydroxylamine des produits de coupure du brin non-codant dans une situation où l'ADN n'a pas été dilué ,

20 - la figure 4D est un agrandissement de régions contenant les pics en position 295 et 317 de la figure 4C , à différentes dilutions .

#### Matériels et méthodes .

##### Echantillons d'ADN

25 36 patients non liés atteints d'angioedème dont l'analyse par des techniques d'hybridations sur membrane (blot) n'a pas révélé d'altérations géniques ont été étudiés et les essais ont porté sur les mutations ponctuelles dans l'exon 8 en utilisant la méthode classique de CCM ( Cotton et al. (1988). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 4397-4401) et la méthode de séquençage de l'ADN .

##### Fabrication de sondes marquées par des marqueurs fluorescents .

30 Des amorces oligonucléotidiques ont été synthétisées sur un synthétiseur Beckman 200A DNA ou 35 un synthétiseur Applied Biosystem 392 ( ABI ) DNA/RNA .

Un microgramme d'ADN génomique isolé à partir de leucocytes du sang périphérique a été amplifié par la technique de polymérisation en chaîne ( dite PCR ) dans un milieu réactionnel de 100 µl , en utilisant 5 des amorce oligonucléotidiques E1 et E2 , comme illustré sur la figure 1A.

La réaction a été effectuée durant 30 à 35 cycles. La sonde marquée par fluorescence a été obtenue par réamplification , durant 25 cycles , en 10 utilisant 2 µl du produit de la première réaction d'amplification et en utilisant les mêmes amorce rendues fluorescentes par couplage d'un ester d'un colorant et du N-hydroxyl succinimide à un coupleur aminohexyl lié à l'extrémité 5' selon le protocole ABI.

15 La séquence de l'oligonucléotide E1, qui est marquée avec le fluorophore JOE est : 5'-GTG AAC TTG AAC TAG AGA AAG C-3' .

20 La séquence de l'oligonucléotide E2, qui est marquée avec le fluorophore FAM , est : 5'- TGA GGA TCC CAC GAA CTG CCA G-3' .

Formation d'hétéroduplex et clivage chimique des mésappariements .

Des fragments amplifiés par polymérisation en chaîne et doublement marqués sont précipités à 25 l'éthanol . Les quantités d'ADN sont estimées sur un gel d'agarose et 450 ng d'ADN sont utilisés afin de former des hétéroduplex . Les échantillons sont portés à ébullition durant 5 minutes dans 150 µl de NaCl 1,3 M/MgCl<sub>2</sub> 3,5 mM/ Tris-HCl 3 mM pH 7,7 , refroidis sur 30 de la glace durant 5 minutes puis incubés durant la nuit à 42°C.

Après hybridation , les échantillons sont précipités avec de l'éthanol et resuspendus dans 18 µl d'eau.

35 Le protocole de base pour effectuer la coupure

chimique des mésappariements a été décrit par Cotton et al. ((1988). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 4397-4401) .

5        6 µl d'hétéroduplex d'ADN sont utilisés pour chaque modification chimique . Pour chaque expérience , 5 ml d'hydroxychlorure d'hydroxylamine 7M sont préparés dans c l'eau distillée et 4 ml sont titrés jusqu'à un pH de 7 par addition de diéthylamine .

10      6 µl d'ADN sont traités par 20 µl d'une solution d'hydroxylamine à 37°C durant 45 minutes ou 1 heure . La concentration finale d'hydroxylamine est approximativement de 3,8 M.

15      Le tétr oxyde d'osmium ( 4 % en poids de la solution dans l'eau ) est dilué dans de l'eau distillée jusqu'à obtention d'une solution de base à 1 % et des aliquotes sont stockés à - 80°C dans des tubes siliconés .

20      6 µl d'ADN sont incubés durant 15 minutes à température ambiante dans une solution de tétr oxyde d'osmium 0,4 % / pyridine 2 % / Hepes pH 8 0,5 mM / Na<sub>2</sub>EDTA 0,5 mM dans un volume total de 25 µl dans des tubes siliconés .

25      Les réactions sont arrêtées en transférant les échantillons dans de la glace et en ajoutant 200 µl d'acétate de sodium 0,3 M pH 5,2/Na<sub>2</sub>EDTA 0,1 mM/tRNA de levure 50 µg/ml. L'ADN est précipité à l'aide de 2,5 volumes d'éthanol dans de la glace carbonique . Après centrifugation , les culots d'ADN sont lavés deux fois avec de l'éthanol à 70 %, resuspendus dans 200 µl d'acétate de sodium 0,3 M pH 5,2 et reprécipités une nouvelle fois par de l'éthanol . Après deux lavages à l'éthanol , les culots séchés sont resuspendus dans 50 µl de pipéridine 1 M et incubés à 90°C durant vingt minutes. Après la coupure par la pipéridine , 5 µg de tRNA de levure et 50 µl

d'acétate de sodium 0,6 M pH6 sont ajoutés et l'ADN est précipité par l'éthanol . Les culots sont levés deux fois avec de l'éthanol à 70 % , resuspendus dans 100 µl d'eau distillée, lyophilisés et resuspendus 5 dans 8 µl de formamide 83 %/Na<sub>2</sub>EDTA 8,3 mM. 4 µl de chaque échantillon , mélangés avec 0,5 µl de marqueur de poids moléculaire fluorescent ( GS2500P ROX, ABI ) sont chargés sur un gel de polyacrylamide dénaturant à 6 % dans un séquenceur d'ADN automatique commercialisé 10 par ABI . Les résultats sont rassemblés et analysés en utilisant le logiciel GENESCAN 672 (ABI) .

EXEMPLE 1 :

Détection de mutations dans le gène Cl-inhibiteur de patients atteints d'angioédème héréditaire .

Des mutations dans le gène Cl-inhibiteur de patients atteints d'angioédème héréditaire constituent un modèle d'étude de la méthode objet de la présente invention .

20 Le gène Cl-inhibiteur est long de 17 kb et est composé de 8 exons . En choisissant les amorces oligonucléotidiques dans des introns et à proximité de l'extrémité 5' et 3' des exons , on peut facilement obtenir par amplification par la méthode de polymérisation en chaîne des fragments de longueurs comprises entre 600 paires de base (pb) et 1000 pb 25 comprenant aussi bien des exons individuels que des groupes d'exons et couvrant toutes les régions frontières intron-exon .

30 L'exon 8 a été amplifié à l'aide des amorces E1 et E2 comme illustré sur la figure 1A qui représente de manière schématique l'organisation de la région contenant l'exon 8 . Comme le montre cette figure , l'amorce E1 est située à l'intérieur de la région 3' non transcrrite , 211 paires de base en aval du codon 35

stop . L'amorce E2 est située quant à elle à l'intérieur de l'intron 7 , 147 paires de base en amont du premier nucléotide de l'exon 8. Les 84 codons de cet exon sont reproduits sur la séquence de la 5 figure 1B.

Huit mutations ponctuelles différentes , la plupart se traduisant par une détérioration de la production de la protéine Cl-inhibiteur, ont été trouvées à l'aide de la technique conventionnelle CCM. 10 De plus , une permutation de G en A à l'intérieur du codon 458 induit un polymorphisme déjà connu pour le site de l'enzyme de restriction Mgi AI (Bock et al. 1986, Biochemistry , 25, 4292-4301 ). Les mutations Gln452Glu ( permutation de C en G ) et Pro459Arg 15 (permutation de T en G ) , qui sont reliées par la ligne pointillée sur la figure 1B, ont été trouvées sur le même chromosome .

L'ADN du patient portant ces mutations a donc 20 été isolé pour rechercher les conditions de clivage partiel qui permettent la détection de mésappariements multiples sur le même brin d'ADN .

Comme le montre la figure 2B , le clivage par 25 l'hydroxylamine des résidus C non appariés sur le brin non codant d'une naissance à deux pics correspondant à des tailles de 295 et 317 nucléotides respectivement . comme on pouvait le prédire à partir des types de molécules hétéroduplex formés qui sont schématiquement représentés sur la figure 2A . Sur la figure 2A, les 30 brins sens sont identifiés par un carré représentant un marquage fluorescent particulier tandis que les brins non-sens sont identifiés par un rond correspondant à un autre marquage.

Les deux pics obtenus présentent une intensité importante , par rapport à l'intensité de la 35 fluorescence du matériel non clivé. On note qu'en fait

seulement un quart des molécules d'ADN sont supposées contenir le mésappariement qui rend les résidus C facilement accessibles à l'hydroxylamine .

Tandis que l'intensité du pic en position 295  
5 reflète directement la nature de la modification et du clivage , l'intensité de fluorescence en position 317, qui est la plus distante par rapport au site de marquage fluorescent , est faible par rapport au clivage supposé à ce site .

10 Ces résultats et des résultats similaires obtenus avec le tétr oxyde d'osmium indiquent que les conditions utilisées permettent la détection de clivages multiples sur le même brin. En fait des conditions légèrement plus douces de traitement par 15 l'hydroxylamine ont été utilisées ultérieurement en raison du faible clivage sur la position la plus lointaine de coupure ( pic 317 ) et ont permis d'obtenir des clivages de l'ordre de 100 %.

La figure 2 illustre aussi que l'on obtient des 20 informations redondantes en marquant les produits correspondant aux deux types d'allèle .

Sur la figure 2A , les brins dérivés d'allèle de type sauvage sont représentés en gras, et les distances des bases intéressantes sont indiquées à 25 partir du marquage fluorescent terminal .

La figure 2B est relative à la coupure par l'hydroxylamine des résidus C non apparié . L'axe horizontal représente la taille des fragments simples brins d'ADN dérivés des brins codants et non codants . 30 L'échelle de taille des nucléotides est obtenue à l'aide du marqueur de taille , qui est marqué avec un troisième colorant fluorescent . L'échelle verticale indique les intensités de fluorescence en unité arbitraire .

35 La figure 2 C représente la détection de

résidus T non appariés en utilisant le tétr oxyde d'osmium .

La flèche présente sur la figure indique un résidu T apparié , adjacent au mésappariement , qui a 5 subi néanmoins une coupure importante .

Dans cet exemple les deux mutations, situées respectivement dans les codons 452 et 459 se sont révélées par un total de six coupures distinctes . Parmi celles-ci deux ont eu lieu sur des bases 10 appariées adjacentes aux mésappariements. Sur le brin codant, les résidus C ont donné naissance à un pic double faible mais significatif en présence d'hydroxylamine autour de la position 362 . Sur le brin non- codant le résidu T a donné naissance après 15 traitement par le tétr oxyde d'osmium au pic en position 316. On notera que les coupures sur des bases appariées adjacentes, quoique habituellement plus faibles que celles obtenues sur des résidus non appariés , peuvent avoir lieu sur la moitié des duplex, et non sur seulement un quart , comme le montre de manière typique le cas de mésappariements contenant des T ou des C .

Le gain en sensibilité de la détection résultant de l'utilisation de marquages différents des 25 deux brins d'ADN, combinée avec l'analyse par ordinateur permet d'obtenir les résultats mentionnés dans l'insert de la figure 25., qui représente un agrandissement du pic double autour de la mutation en 30 position 362 du brin codant , en surimpression sur les tracés du résultat obtenu sur un même brin pour trois individus n'ayant pas cette mutation . On note que des clivages ont lieu sur les cytosines en position 357 et 369.

EXEMPLE 2 :

35 Effet du type de base non appariée et de la

composition en bases voisines , sur les coupures par le tétr oxyde d'osmium et l'hydroxylamine .

Les neuf mutations représentées sur la figure 1 ont permis d'étudier l'effet quantitatif du type de base non appariée et de la composition en bases voisines , sur les coupures par les deux réactifs .

Le tableau illustre les comparaisons effectuées à partir de deux expériences indépendantes . Tandis que les efficacités de coupure obtenues avec l'hydroxylamine sont substantiellement supérieures à celles obtenues avec le tétr oxyde d'osmium, l'environnement nucléotidique des mésappariements semble avoir un effet similaire sur les deux types de clivage , puisqu'on retrouve la même hiérarchisation des efficacités de coupure pour les deux réactifs .

Seulement quelques mutations ne répondent pas à cette règle . Par exemple , les mutations Pro 476 Ser et Leu 459 Pro sont plus sensibles aux modifications par l'hydroxylamine , ce qui est dû à la présence dans les deux cas de trois résidus cytosine consécutifs sur le site de clivage . De manière similaire , le taux de coupure relativement important par le tétr oxyde d'osmium des hétéroduplex sur le site Val451Met est probablement dû à la présence de deux résidus T consécutifs adjacents au T mésapparié . Cependant des mésappariements C.C se distinguent par leur sensibilité importante aux modifications , bien que placés au sein d'un environnement nucléotidique différent . Ceci peut être dû non seulement à la coupure forte par l'hydroxylamine mais aussi à la coupure forte observée en présence de tétr oxyde d'osmium sur les résidus T immédiatement adjacents.

Dans le cas de la mutation Gln452 Glu, l'asymétrie apparente de l'efficacité de coupure , dépendante du brin pris en compte , peut être aussi

due à la présence sur le brin non codant d'un résidu C adjacent à un résidu non apparié .

Le tableau permet aussi d'estimer le nombre de produits de clivage qui peuvent être attendus en 5 général pour chaque mutation ainsi que l'indication des limites de détection des produits dans le cas de coupures faibles .

Chaque mutation donne naissance à au moins deux 10 pics fluorescents détectables résultant du clivage de bases mésappariées , mais dans plusieurs cas , des informations additionnelles ont été obtenues à partir du clivage de bases appariées adjacentes , indiquées dans le tableau par des flèches .

La grande majorité des produits de coupure sont 15 facilement détectés , à cause de l'intensité de leur signal fluorescent qui est très nettement supérieur au bruit de fond. La surimpression de tracés telle qu'effectuée dans l'insert de la figure 2B est nécessaire seulement dans le cas de signaux 20 représentant moins de 10 % des double brins clivables, tels que ceux obtenus avec le tétr oxyde d'osmium sur des mésappariements résultant des mutations Arg472 STOP et Val458Met (tableau ).

Le profil de coupure par le tétr oxyde d'osmium 25 d'un patient hétérozygote pour la mutation Val458Met , qui donne naissance à un polymorphisme sans effet , et pour la mutation pathogène Pro467Arg est illustré sur les figures 3B et 3C .

Le polymorphisme de la mutation Val458Met est 30 facilement détecté , par traitement par l'hydroxylamine , et identifié par un pic à la position 299 du brin non codant , comme indiqué sur la figure 3A qui est un schéma représentant la partie du gène contenant ces deux mutations .

35 Sur la figure 3A les brins d'ADN représentés

par des lignes épaisses sont ceux dérivés de l'allèle présentant à son site polymorphique un résidu G, ce qui est le plus fréquent.

5 Ce pic n'est néanmoins pas discernable dans le cas du traitement au tétr oxyde d'osmium par mesure directe de la fluorescence du brin non codant , qui porte un T mésapparié au site correspondant à cette mutation (figure 3B) . Cependant , le brin codant présente une coupure beaucoup plus forte , à la 10 position 387, due à la présence d'un résidu T immédiatement adjacent au mésappariement déstabilisant C.C et G.G. à la moitié des molécules appariées .

De plus , la comparaison des tracés agrandis de 15 la même région dans le cas du traitement d'ADN d'autres individus par le tétr oxyde d'osmium , comme représenté dans l'insert de la figure 3B, montre que T est en fait présent à la position 299 du brin non codant . La réactivité avec le tétr oxyde d'osmium de ce mésappariement T-G est inhabituellement faible . Ceci est dû au fait que l'intensité du pic résultant 20 est seulement légèrement supérieure à celle des bases T.A appariées environnantes , comme le montre l'insert représentant le brin non codant à partir de la position 283 jusqu'à la position 316.

25 On notera néanmoins que ce mésappariement G.T est présent seulement dans un des quatre duplex . Le profil témoin montré dans l'insert , dans lequel le pic en position 299 n'est pas présent , est celui d'individus homozygotes G.C à ce site polymorphique . En fait , les variations entre individus , c'est-à- 30 dire entre homozygotes A.T et G.C à ce site polymorphique peuvent être facilement détectées comme le montrent les figures 3C et 3D , correspondant respectivement à des traitements par le tétr oxyde d'osmium et l'hydroxylamine .

Le profil en tétr oxyde d'osmium (figure 3 C) de l'homozygote en position 299 est de manière suprenante similaire à celui de l'hétérozygote dans l'insert de la figure 3B , à l'exception du pic en position 299 qui est faiblement inférieur à ce qui est mis en évidence avec les mésappariements G.T. De plus, les homozygotes C.G , utilisés comme témoins non coupés dans les figures 3B et 3C , donnent naissance à un pic distinct dans le profil obtenu après réaction avec l'hydroxylamine , contrairement au profil obtenu avec des homozygotes A.T ( figure 3D). Bien que cet exemple représente le cas particulier d'un site polymorphique , qui c ne naissance à des génotypes appropriés pour faire la différence entre un clivage de bases appariées et non appariées , l'apparition d'un nouveau pic T ou C absent dans le profil d'autres individus , est un indice suffisant même si l'amplitude de ce pic est du même ordre que celui résultant du clivage de paires de bases environnantes.

EXEMPLE 3 :

Détermination du seuil de détection de la méthode .

Un patient avec une double mutation en cis , dont le profil de coupure est indiqué sur les figures 2B et 2C , donne naissance à un nombre important de fragments d'intensités variables , ce qui permet de tester facilement le seuil de détection de la méthode, en diluant ce matériel avec différentes quantités du matériel génétique sauvage . De plus, la région amplifiée par voie enzymatique du chromosome affecté de ce patient peut être détaillée de manière quantitative dans des dilutions en série , car Leu459Arg détruit le site de reconnaissance de l'enzyme Hgi AI, souligné dans la figure 1.

L'ADN génomique de ce patient a été dilué avec

des quantités croissantes d'ADN normal et amplifié par la voie enzymatique . L'importance du chromosome portant les mutations a été vérifiée , après la première amplification par polymérisation de chaîne (PCR) en étudiant dans des dilutions en séries la disparition du fragment de 588 paires de bases représenté sur la figure 4A , qui est résistant à la digestion par l'enzyme Hgi AI. Des aliquotes de chaque dilution en séries ont été ensuite soumis aux modifications chimiques par le tétr oxyde d'osmium et l'hydroxylamine .

La figure 4B montre que jusqu'à une dilution d'un facteur cinq de l'ADN , c'est-à-dire un chromosome portant la mutation pour dix chromosomes , les mésappariements sont facilement détectés .

Afin de simplifier les figures , on a fait figurer simplement le résultat de la coupure par l'hydroxylamine du brin non codant , pour de l'ADN non dilué et dilué , puisque des diminutions similaires d'intensité sont mesurées , après dilution , dans les autres profils de clivage de la figure 2.

La figure 4B est un gel sur lequel sont représentées les différentes dilutions de l'ADN ainsi que de l'ADN témoin de type sauvage (puits C) .

La figure 4C représente le profil du brin non codant , après traitement de l'ADN par l'hydroxylamine, pour le patient hétérozygote et dans une situation où l'ADN n'a pas été dilué.

La figure 4D est un agrandissement de la région contenant les pics aux positions 295 et 317. Sur cette figure, on a indiqué les intensités des pics à une dilution de moitié (1/2) du dixième (1/10) ainsi que l'intensité du spectre obtenu avec l'ADN témoin d'un individu de type sauvage .

Même le pic double obtenu avec l'hydroxylamine

pour le brin codant autour de la position 362 ( cf. insert de la figure 2A ) est détectable , à une dilution d'1/10 du chromosome .

CONCLUSION :

5 Les résultats de ces exemples de mise en oeuvre de l'invention montrent de manière claire que la méthode objet de la présente invention permet de déterminer, de manière fiable et sensible , la présence et la position de substitutions de bases dans  
10 des séquences nucléotidiques .

Cette détection est rendue possible du fait du double marquage différentiel des deux brins , à l'aide de marqueurs fluorescents .

15 La méthode objet de la présente invention est en outre mise en oeuvre de manière plus rapide que la méthode conventionnelle CCM , et présente de plus l'avantage d'utiliser des produits de marquage fluorescents stables .

20 La méthode objet de la présente invention diffère en outre des méthodes décrites dans l'état de la technique en ce que :

25 - elle permet d'obtenir de manière optimale un grand nombre de mésappariements et donc d'informations, du fait du marquage de l'allèle mutant,

- les brins codant et non-codant sont marqués de manières différentes , ce qui réduit ainsi au minimum le nombre de réactions chimiques et permet une localisation précise des mutations ,

30 - le bruit de fond spécifique d'un brin donné lors des coupures à une position donnée est très reproductible et rend détectable des mésappariements qui ordinairement sont peu coupés , tels que des polymorphismes homozygotes , comme le montre la figure  
35 3 . Ainsi , en utilisant le bruit de fond des coupures

comme séquence de référence , on peut séquencer la mutation de manière précise , au nucléotide près .

La sensibilité particulièrement importante de la méthode objet de la présente invention devrait permettre de déterminer la présence et la position de substitutions de base chez des individus homozygotes et hétérozygotes , dans le cas de caractère héréditairement transmis , mais aussi de détecter des mutations somatiques dans lesquelles le chromosome sur lequel a lieu la mutation est dilué dans un grand nombre de chromosomes portant une allèle sauvage , ce que ne permettent en aucune manière les méthodes décrites dans l'état de la technique .

**TABLEAU**  
**Comparaison de l'environnement en bases sur la coupe de séraparlements:**  
**TÉTRONOXIDE d'OSMIUM**

Mutation	environnement	Coupera (a) Exp1	Coupera (a) Exp2	Mutation	Méthaparlement	coupera (a) Exp1	coupera (a) Exp2
Arg472stop	GGGCGAGT CCCCACTCA	24	21	Arg472stop	GGGGTCAGT CCCCCTCA	< 1	< 1
Val1450Met	CTTCATCC GAAGCAGAA	40	34	Val1450Met	CTTCCTGCT GAAGTACCA	2	4
Val1451Met	TGAAATCCA ACTTGACCT	43	40	Pro476Ser	TGACTTCAG ACTGGCTC	10	0
Phe455Ser	CCCFCCTC GGGAGGAC	50	53	Phe455Ser (b)	CCCTTCCTC (b) GGGAGGAC	ND(c)	0
Leu459Arg	CTTCCTCTGG CACGGGAGCC	57	49	Leu459Pro (b)	CTGCCCTGG CACGGGAGCC	2.1	1.1
Pro476Ser	TTAACCCAG ACTTAACAC	56	50	Val1451Met (b)	TCAAATGCA ACTTAACAC	34	19
Leu459Pro	GTGGCTTCG CACGGAGAC	61	62	Leu459Arg (b)	CACCGGACCC CACGGGAGCC	4.1	3.1
Cln452Glu	ACTGCAGCA (d) TCAGCTCC	67	66				

FEUILLE DE REMPLACEMENT (RÈGLE 26)

**TABLEAU (suite)**  
**Comparaison de l'environnement en bases sur la coupe de mésappariements**

Mutation mésappariement:	comparaison (a)		
	Exp1	Exp2	
Pro467Arg	TTCCTCTTC(d) AAGGCCAG	0.2	7.9
Pro467Arg	T'CCCTCTTC(d) AACGCAAC	0.4	6.4
Gln452Glu	AGTCCAGGCA(d) TCACCTCGT	100	6.9

(a) Exprimée comme le pourcentage des molécules pouvant être clivées théoriquement présentes, ces pourcentages sont calculés comme le rapport de la fluorescence mesurée pour les produits clivés par rapport au quotient de l'ADN total et corrigés, quand le même brin est clivé à deux sites, en ce qui concerne l'effet du clivage proximal sur l'intensité observée pour le clivage distal.

- (b) Mésappariements déportés en superposant les tracés.
- (c) Non effectués dans cette série. Dans d'autres expériences, l'étendue des modifications induites par le tétraoxyde d'osmium est similaire à celle induite pour la mutation Pro476Ser.
- (d) Des clivages avec le tétraoxyde d'osmium dans des résidus T adjacents ont été mis en évidence.

REVENDICATIONS

1. Procédé de détection de la présence et de la position de substitutions ou de délétions de bases dans une séquence nucléotidique comprise dans une préparation d'ADN double brin à tester dans lequel :

- on amplifie de manière spécifique la région contenant la séquence nucléotidique d'une part de l'ADN à tester et d'autre part d'un ADN dont la séquence est connue, et l'on marque les brins sens et non sens de ces ADN à l'aide de marqueurs fluorescents, ou de marqueurs non-isotopiques, différents.

15 - on hybridise les ADN amplifiés, et  
- on met en évidence les hétéroduplex formés par clivage des parties des brins non-appariées.

2. Procédé de détection de la présence et de la position de substitutions ou de délétions de bases d'une séquence nucléotidique comprise dans une préparation d'ADN double brin hétérozygote ou hétérogène à tester dans lequel :

25 - on amplifie de manière spécifique la région contenant la séquence nucléotidique de l'ADN à tester et on marque les brins sens et non sens de cet ADN à l'aide de marqueurs fluorescents, ou de marqueurs non-isotopiques, différents,

- on hybridise l'ADN amplifié, et  
30 - on met en évidence les hétéroduplex formés par clivage des parties des brins non-appariées.

3. Procédé selon la revendication 2 caractérisé en ce que l'ADN hétérogène est constitué d'un mélange d'ADN de deux variants d'une bactérie ou d'ADN extrait de cellules mosaïque d'une tumeur.

35 4. Procédé selon la revendication 1 caractérisé en ce que l'ADN à tester et l'ADN connu sont amplifiés

dans la même préparation .

5. Procédé selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que le réactif coupant les parties non appariées est un réactif chimique , tel que l'hydroxylamine ou le tétr oxyde d'osmium.

6. Procédé selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que le réactif coupant les parties non appariées est une enzyme, telle que la MutY.

10 7. Procédé selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que les hétéroduplex sont, préalablement à leur mise en évidence, concentrés par passage sur un support les retenant spécifiquement.

15 8. Procédé selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que les ADN comprenant la séquence nucléotidique à déterminer sont amplifiés par la méthode de polymérisation en chaîne à l'aide de deux amores situées aux deux extrémités de la séquence que l'on veut amplifier.

20 9. Procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce que les deux amores sont marquées respectivement à l'aide de marqueurs fluorescents différents.

25 10. Procédé selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisé en ce que la taille de la molécule d'ADN double brin correspondant à la séquence nucléotidique est comprise entre 150 et 10.000 paires de bases.

30 11. Procédé de détection de la présence de substitutions ou de délétions de bases dans une séquence nucléotidique comprise dans une préparation d'ADN double brin à tester dans lequel :

35 - on amplifie de manière spécifique la région contenant la séquence nucléotidique d'une part de l'ADN à tester et d'autre part d'un ADN dont la

séquence est connue,

- on hybridise les ADN amplifiés , et
- on met en évidence les hétéroduplex formés par passage sur un support les retenant spécifiquement.

5 12. Procédé de détection de la présence de substitutions ou de délétions de bases dans une séquence nucléotidique comprise dans une préparation d'ADN double brin hétérozygote ou hétérogène à tester dans lequel :

- 10 - on amplifie de manière spécifique la région contenant la séquence nucléotidique de l'ADN à tester,
- on hybridise l'ADN amplifié, et
- on met en évidence les hétéroduplex formés par passage sur un support les retenant spécifiquement.

15 13. Procédé selon l'une des revendications 7, 11 et 12 caractérisé en ce que ledit support porte une protéine liant de manière spécifique les hétéroduplex.

20 14. Procédé selon la revendication 13 , caractérisé en ce que ladite protéine est la MutS.

25 15. Procédé selon l'une des revendications 11 et 12, caractérisé en ce que les hétéroduplex retenus sont révélés par une molécule se fixant spécifiquement sur l'ADN, telle que le bromure d'éthidium.

16. Composition comportant au moins trois sondes permettant de former des hétéroduplex avec des séquences nucléiques dans lesquelles on recherche la présence ou l'absence de mutations ponctuelles.

30 17. Hétéroduplex associé à un complexe constitué par une molécule de type MutS et un anticorps anti-MutS

1 / 4

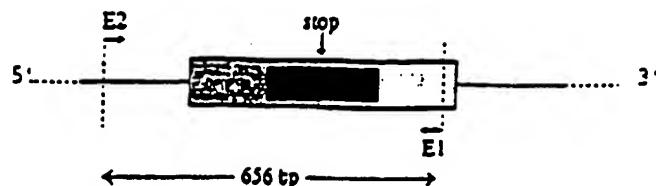


FIG. 1A

AA TTC TTC GAT TTT TCT TAT GAC CTT AAC CTG TGT GGG  
 Glu Phe Phe Asp Phe Ser Tyr Asp Leu Asn Leu Cys Gly  
  
 CTG ACA GAG GAC CCA GAT CTT CAG GTT TCT GCG ATG CAG CAC CAG ACA  
 Leu Thr Glu Asp Pro Asp Leu Gln Val Ser Ala Met Gln His Gln Thr  
  
 GTG CTG GAA CTG ACA GAG ACT GGG GTG GAG GCG GCT GCA GCC TCC GCC  
 Val Leu Glu Leu Thr Glu Thr Gly Val Glu Ala Ala Ala Ala Ser Ala  
  
 C340  
 C.T320 C317 (316) C.T350  
 ATC TCT GTG GCC CGC ACC CTG CTG GTC TTT GAA GTG CAG CAG CCC TTC  
 Ile Ser Val Ala Arg Thr Leu Leu Val Phe Glu Val Gln Gln Pro Phe  
  
 A G C  
 Met Glu Ser  
 451 452 455  
  
 C.T362  
 357 378 362 369 283  
 C.T362 C295  
  
 CTC TTC GTG CTC TGG GAC CAG CAG CAC AAG TTC CCT GTC TTC ATG GGG  
 Leu Phs Val Leu Trp Asp Gln Gln His Lys Phe Pro Val Phe Met Gly  
  
 A C G  
 Met Pro Arg  
 458 G 467  
 G  
 Arg  
 459  
  
 T400 C.T412  
 CGA GTA TAT GAC CCC AGG GCC TGA  
 Arg Val Tyr Asp Pro Arg Ala  
 T T  
 Stop Ser  
 472 476

FIG. 1B

2/4

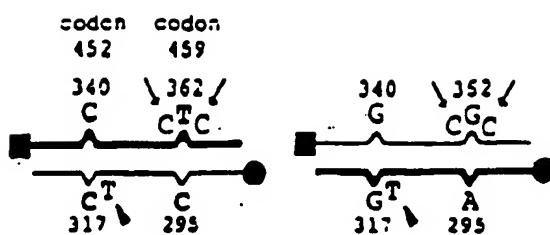


FIG. 2A

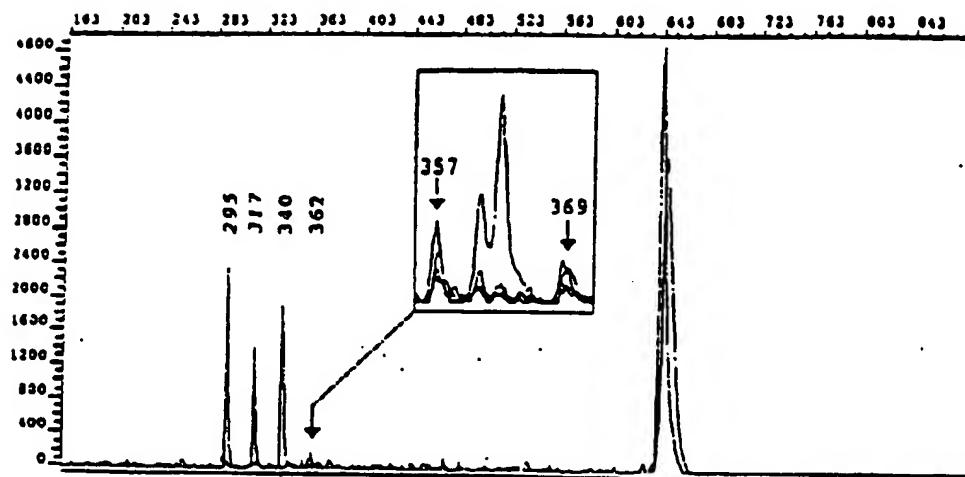


FIG. 2B

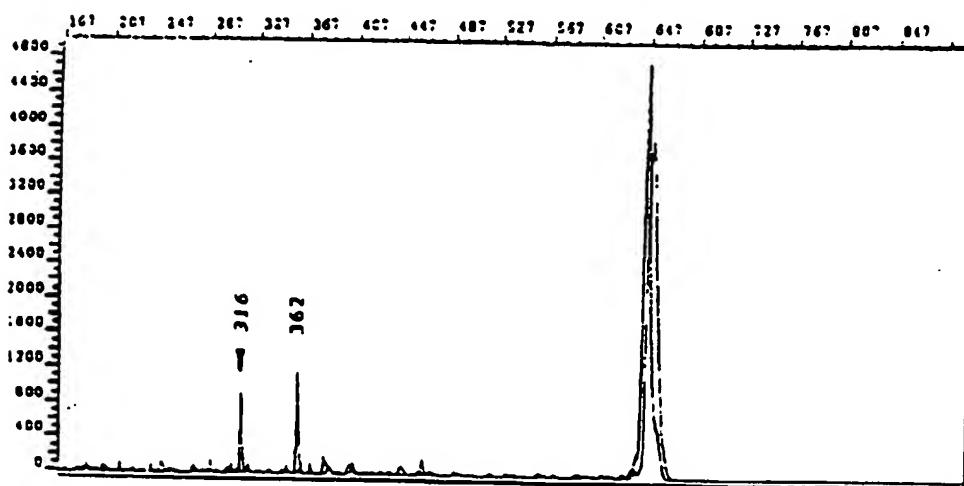


FIG. 2C

3/4

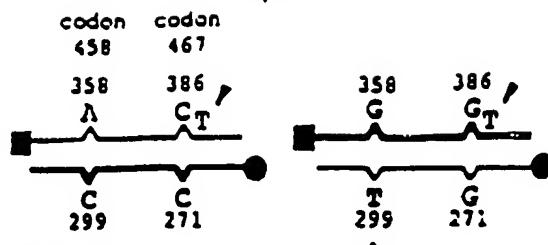


FIG. 3A

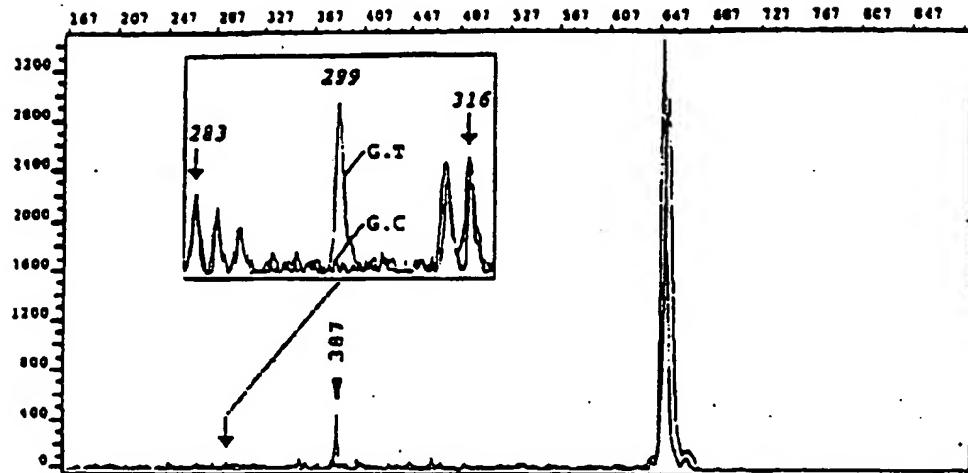


FIG. 3B

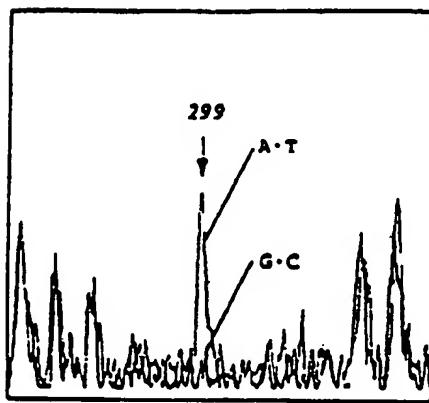


FIG. 3C

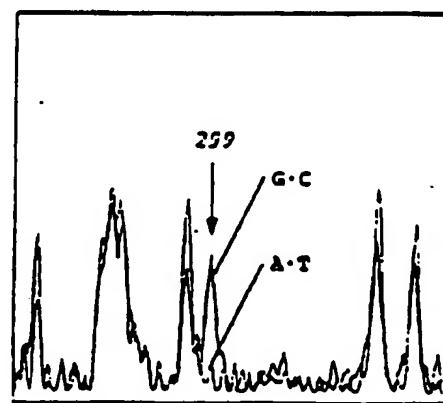


FIG. 3D

4 / 4

$\frac{5}{10}$   $\frac{1}{10}$   $\frac{3}{10}$   $\frac{2}{10}$   $\frac{1}{10}$  6

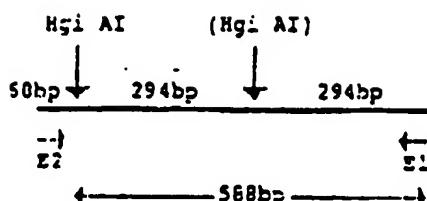
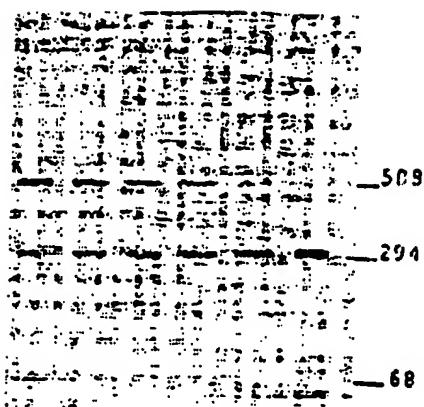


FIG. 4A



**FIG. 4B**

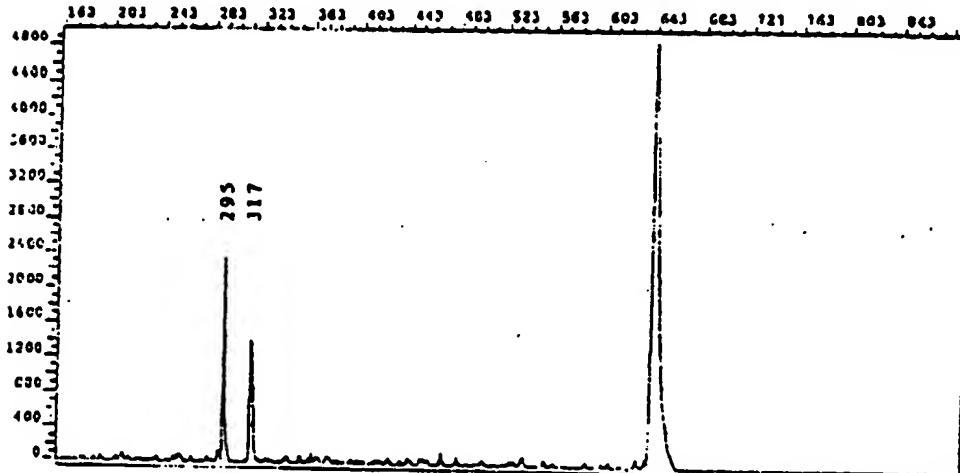


FIG. 4C

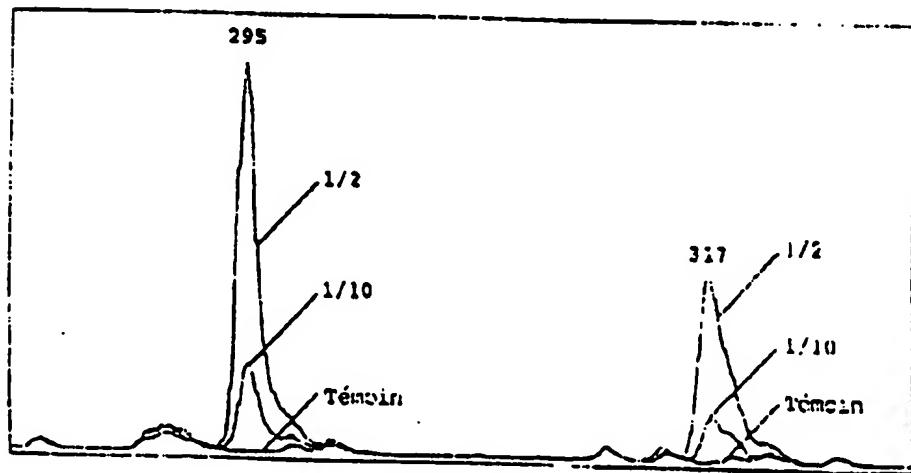


FIG. 4D

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
 IPC 6 C12Q1/68 C12P19/34 G01N33/53

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where present, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Class or document with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOGENETICS, vol.18, 1991, OXFORD, UK pages 147 - 153 WOOD, N. ET AL 'HLA-DR/Dw MATCHING BY PCR FINGERPRINTING' see the whole document ---	1-10, 13, 14
Y	HUMAN MOLECULAR GENETICS, vol.2, no.9, September 1993, UK. pages 1481 - 1482 HIEDL, W ET AL 'single-step screening method for the most common mutations in familial adenomatous polyposis' see the whole document ---	1-10, 13, 14 -/-

Further documents are listed in the continuation of box C.

Parent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents :

- 'A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- 'E' earlier document but published on or after the international filing date
- 'L' document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another claimed or other special prior art (as specified)
- 'D' document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- 'T' document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

'T' later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

'X' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

'Y' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

'A' document member of the same patent family

Date of the oral completion of the international search

21 December 1994

Date of mailing of the international search report

02.01.95

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.O. Box 3018 Petrussestrasse 3  
NL - 2280 MV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 342-3000, Fax. 31 631 000 01  
Fax. (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Osborne, H

C(ONSTRUCTION) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Class or document with indication, where appropriate, of the relevant passage	Relevant to claim No.
Y	HUMAN GENETICS, vol.87, no.6, 1991, BERLIN, DE. pages 728 - 730 CAI, S-P. ET AL 'a rapid and simple electrophoretic method for the detection of mutations involving insertion or deletion.' ---	1-10,13, 14
Y	WO,A,90 13668 (LIFECODES CORP.) 15 November 1990 see page 9 - page 18; claims 1-4 ---	1-10,13, 14
Y	EP,A,0 317 239 (NATIVE PLANTS INCORP.) 24 May 1989 see page 8 - page 9; claims 1,2 ---	1-10,13, 14
X	WO,A,93 02216 (UPSTATE BIOTECHNOLOGY INC) 4 February 1993	11,12, 15-17
Y	see the whole document	1-10,13, 14
	* in particular page 54*	
X	WO,A,89 11548 (CETUS CORP.) 30 November 1989 see example 5 ---	16
A	GENOMICS; vol.14, no.2, October 1992, SAN DIEGO US pages 249 - 255 LU, A-L. ET AL. 'detection of single base mutations with mismatch repair enzymes' cited in the application see the whole document ---	6
X	MUTATION RESEARCH, vol.285, 1993, AMSTERDAM NL pages 125 - 144 COTTON, R. 'Current methods of mutation detection' see page 137 -----	1-5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT  
Information on patent family membersInternational application no.  
PCT/FR 94/01068

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO-A-9013668	15-11-90	AU-A-	5645690	29-11-90
EP-A-0317239	24-05-89	JP-A-	2002400	08-01-90
		US-A-	5324631	28-06-94
WO-A-9302216	04-02-93	AU-A-	2415992	23-02-93
		CA-A-	2113716	04-02-93
		EP-A-	0596028	11-05-94
WO-A-8911548	30-11-89	AU-B-	632494	07-01-93
		AU-A-	3754289	12-12-89
		EP-A-	0451141	16-10-91
		JP-T-	3504328	26-09-91

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale N°.  
PCT/FR 94/01068A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE  
CIB 6 C1201/68 CI2P19/34 G01N33/53

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTÉ

Documentation internationale enregistrée (système de classification suivi des symboles de classement)  
CIB 6 C120

Documentation concernant avec que la documentation en rouvrable dans le secteur ou ces documents peuvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Bases de données cherchées consultées au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, si ce cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

## C. DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	N° des revendications vues
Y	EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOGENETICS, vol.18, 1991, OXFORD, UK pages 147 - 153 WOOD, N. ET AL 'HLA-DR/Dw MATCHING BY PCR FINGERPRINTING' voir le document en entier ---	1-10, 13, 14
Y	HUMAN MOLECULAR GENETICS, vol.2, no.9, Septembre 1993, UK. pages 1481 - 1482 FRIEDL, W ET AL 'single-step screening method for the most common mutations in familial adenomatous polyposis' voir le document en entier -- -/-	1-10, 13, 14

Voir le texte du cadre C pour la fin de la liste des documents       Les documents de famille de brevets sont indiqués en annexe

## \* Catégories spéciales de documents cités:

- \*'A' document détaillant l'état général de la technique, non nécessaire toutefois particulièrement pertinent
- \*'E' document ancien, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- \*'L' document pouvant prêter un dossier de vos revendications de priorité ou être utilisé pour déterminer la date de publication d'une autre classe ou pour une raison spéciale (elle qui indique)
- \*'G' document se référant à une invention ancienne, à un usage, à une exploitation ou tous autres moyens
- \*'P' document publié avant la date de dépôt international, mais postérieur à la date de priorité revendiquée

- \*'T' document divulgué public après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais nécessaire pour comprendre le principe ou le contexte constituant la base de l'invention
- \*'X' document perturbant mais pertinent, l'invention revendiquée et peut être considéré comme nouveau ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré toutefois
- \*'Y' document perturbant mais pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour les personnes du métier
- \*'Z' document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été efficacement achevée

21 Décembre 1994

Date à laquelle du présent rapport de recherche internationale

02.01.95

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.R. 3018 Pessac-Lauzerte  
33 - 3320 HV Ausson  
Tel. (+ 33-50) 340-2000, Tel. 31 631 ext. n°  
Fax (+ 33-50) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Osborne, H

C(000) DOCUMENTS CONSULTÉS COMME PERTINENTS		REP. DES PERTINENCES PUBLIQUES
Caractère *	Déscription des documents consultés avec le cas général. L'indication est paragraphe paragraphe	
Y	HUMAN GENETICS, vol.187, no.6, 1991, BERLIN, DE. pages 728 - 730 CAJ, S-P. ET AL 'a rapid and simple electroretic method for the detection of mutations involving insertion or deletion.'	1-10, 13, 14
Y	--- WO,A,90 13668 (LIFECODES CORP.) 15 Novembre 1990 voir page 9 - page 18; revendications 1-4 ---	1-10, 13, 14
Y	EP,A,0 317 239 (NATIVE PLANTS INCORP.) 24 Mai 1989 voir page 8 - page 9; revendications 1,2 ---	1-10, 13, 14
X	WO,A,93 02216 (UPSTATE BIOTECHNOLOGY INC) 4 Février 1993 voir le document en entier ---	11, 12, 15-17
Y	* particulièrement page 54* ---	1-10, 13, 14
X	WO,A,89 11548 (CETUS CORP.) 30 Novembre 1989 voir exemple 5 ---	16
A	GENOMICS, vol.14, no.2, Octobre 1992, SAN DIEGO US pages 249 - 255 LU, A-L. ET AL. 'detection of single base mutations with mismatch repair enzymes' cité dans la demande voir le document en entier ---	6
X	MUTATION RESEARCH, vol.285, 1993, AMSTERDAM NL pages 125 - 144 COTTON, R. 'Current methods of mutation detection' voir page 137 -----	1-5

**RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE**

Recommandations relatives aux auteurs de familles de brevets

Demande internationale No.

PCT/FR 94/01068

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevets	Date de publication
WO-A-9013668	15-11-90	AU-A-	5645690
EP-A-0317239	24-05-89	JP-A-	2002400
		US-A-	5324631
WO-A-9302216	04-02-93	AU-A-	2415992
		CA-A-	2113716
		EP-A-	0596028
WO-A-8911548	30-11-89	AU-B-	632494
		AU-A-	3754289
		EP-A-	0451141
		JP-T-	3504328